

## 利用 SSR 标记分析玉米群体遗传变异的取样方法

刘 雪\* 李明顺\* 李新海 田清震 白 丽 张世煌\*\*

(中国农业科学院作物科学研究所/农业部作物遗传育种重点开放实验室, 北京 100081)

**摘 要:** 针对 4 种多株叶片混合 DNA 取样方法, 利用 SSR 标记分析了 Pbb69 和 Pbb70 群体的遗传变异, 探讨建立玉米群体遗传多样性分析的技术体系。从 2 个群体中分别提取 50 个单株叶片 DNA 和 5、10、15、20 个单株叶片混合样本 DNA, 用均匀分布在玉米染色体上的 17 对 SSR 引物对不同处理的混合 DNA 样本进行扩增, 通过聚丙烯酰胺凝胶电泳, 比较了采用不同取样方法的叶片 DNA 扩增的等位基因数目、多态性信息量和遗传多样性指数, 表明用 10 株叶片混合提取的 DNA 样本可以代替相同数目(10 个)的单株 DNA 的混合样本。该技术策略可以进一步减少工作量, 提高效率, 已用于研究大量玉米群体的遗传关系。

**关键词:** 玉米群体; SSR 标记; 遗传多样性; DNA 样本

中图分类号: S513

## Sampling Method for Genetic Variation Survey in Maize Populations Detected by SSR Markers

LIU Xue\*, LI Ming-Shun\*, LI Xin-Hai, TIAN Qing-Zhen, BAI Li, ZHANG Shi-Huang\*\*

(Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences/ Key Laboratory of Crop Genetic & Breeding, Ministry of Agriculture, Beijing 100081, China)

**Abstract:** Genetic diversity in maize (*Zea mays* L.) plays a key role for future breeding efforts. Diallel analysis was used commonly to detect the genetic variation among or in maize populations, which makes great efforts to facilitate hybrid development. In recent years, molecular markers are convinced as a powerful tool in detecting the genetic diversity among maize inbred lines, while it remains under investigation and optimization in analyzing maize populations. The objectives of the current research were to use SSR to (1) compare the genetic information analyzed with different bulking DNA samples, and (2) establish the technique procedure to detect genetic variation in maize populations. The modified CTAB method was used to extract DNA of 50 individuals of each population and DNA samples from leaf mixture of 5, 10, 15 and 20 individuals, respectively. 17 SSR primers selected from 10 chromosomes of maize were employed for PCR amplification of DNA samples from leaf mixture. PCR products were separated in denaturing polyacrylamide gels in 1 × TBE buffer, 2 μL of each PCR product were pooled. The results showed that the DNA from leaf mixture of 10 individuals was identified to be the best choice to replace the DNA mixture from the same number of individuals through comparing the number of alleles, polymorphism information content value and diversity index (Table 2, 3), and allele number amplified with the DNA samples from leaf mixture of 5 and 10 individuals was significantly correlated with that with DNA mixture from the same number of individuals in two populations (Pbb69:  $r = 0.913$  and  $0.913$ ; Pbb70:  $r = 0.909$  and  $0.869$ ;  $P < 0.05$ ; Table 4). In addition, the results of PCR amplification among DNA samples from leaf mixture and the mixture sample of individual DNA were compared and showed that the DNA samples from leaf mixture is the optimum substitute for the mixture sample of individual DNA (Table 5). Finally, the DNA extracted from leaf mixture of 10 individuals was confirmed as a labor saving and efficient approach to analyze the maize population diversity. Now the bulking fingerprinting method has been adopted to analyze the genetic relationships among maize populations with polyacrylamide gel electrophoresis.

**Key words:** Maize population; Simple sequence repeat marker; Genetic diversity; DNA sample

基金项目: 农业部 948 重大国际合作(Q2003-3)、国家自然科学基金(30300223)和亚洲玉米生物技术协作网项目资助。

作者简介: 刘 雪(1979-), 女, 河北人, 硕士研究生, 从事玉米种质改良与生物技术研究; \*并列第一作者: 李明顺(1973-), 男, 河北昌黎人, 助理研究员, 主要从事玉米遗传育种及种质改良研究。

\*\*通讯作者(Corresponding author): 张世煌。Tel: 010-68918596; Fax: 010-68975212; E-mail: zhangshh@mail.caas.net.cn

Received(收稿日期): 2004-09-03, Accepted(接受日期): 2004-12-13.

形态标记、细胞学标记、生理或生化标记、系谱分析以及数量遗传学方法等都被用于植物分类和进化研究,而分子标记的发展为物种在 DNA 水平上的遗传多样性研究提供了新的工具<sup>[1]</sup>。RFLP、RAPD、SSR 和 AFLP 等分子标记先后被用于玉米 (*Zea mays* L.) 自交系的遗传变异研究<sup>[2~5]</sup>。近年来,分子标记技术也被用于群体的遗传变异分析<sup>[1, 6, 7]</sup>。

利用分子标记研究异质结合群体的遗传多样性涉及到抽样策略。Marshall 等<sup>[8]</sup>认为在一个群体中选取 59 个或者更多的不相关配子就足够有 95% 的概率检测到群体中基因频率大于 5% 的等位基因。利用分子标记检测大量单株的遗传变异,可以最大程度地反映群体的遗传基础,但是采用分子标记大规模地分析单株,进而检测群体的遗传多样性将花费很多的人力和物力。Reif 等<sup>[1]</sup>分别从 7 个玉米群体中提取 48 个单株的 DNA,通过采用聚丙烯酰胺凝胶电泳和 85 对 SSR 引物划分了群体的杂种优势群,这相当于分析 336 个自交系的杂种优势群的工作量。为降低费用、提高效率,混合取样方法是可供选择的技术策略。Dubreuil 等<sup>[9]</sup>提出用多个单株叶片 DNA 的混合样本作为模板进行群体遗传多样性分析,并通过自交系的遗传多样性分析从理论上评价了混合取样的可行性。但是用群体来证明混合取样的可行性至关重要,因为群体与自交系在遗传结构上存在很大区别。本文的目的在于:(1)通过聚丙烯酰胺凝胶电泳和 SSR 标记对 2 个群体的单株 DNA 和多株叶片混合提取的 DNA 样本的遗传变异分析,明确用多株叶片混合取样方法研究玉米群体遗传变异的可行性;(2)通过对多株叶片混合提取的 DNA 和单株 DNA 混合样本的比较分析,确定用多株叶片混合提取的 DNA 样本研究群体遗传变异的可行性。研究结果将用于确立玉米群体遗传多样性分析的技术策略。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

以优质蛋白玉米群体 Pbb69 和 Pbb70(表 1)为材料。分别从 2 个群体中提取 50 个单株 DNA,同时提取 5、10、15 和 20 个单株叶片混合样本的 DNA。其中,单株 DNA 样品(共 50 个样本)用 A 表示,5 株叶片混合提取的 DNA(共 10 个混合样本)用 B 表示,10 株叶片混合提取的 DNA(共 5 个混合样本)用 C 表示,15 株叶片混合提取的 DNA(共 3 个混合样本)用

D 表示,20 株叶片混合提取的 DNA(共 2 个混合样本)用 E 表示,每个群体共获得 70 个 DNA 样本。

在聚丙烯酰胺凝胶上第 1 泳道是分子量标准(pBR322/ *Msp* ),将接下来的 65 个泳道分成 5 组,即每 13 个泳道为 1 组。其中,第 1 组的 2~11 泳道是 1~10 号单株 DNA 样本,第 12 和 13 泳道分别是 1~5 号和 6~10 号单株叶片混合提取的 DNA 样本,第 14 泳道是 1~10 号单株叶片混合提取的 DNA 样本,第 2 组的 15~24 泳道是 11~20 号单株 DNA 样本,第 25 和 26 泳道分别是 11~15 和 16~20 号单株叶片混合提取的 DNA 样本,第 27 号泳道是 11~20 号单株叶片混合提取的 DNA 样本,依次类推。第 66、67 和 68 泳道分别是 1~15、16~30 和 31~45 号单株叶片混合提取的 DNA 样本;第 69 和 70 泳道分别是 1~20 和 21~40 号单株叶片混合提取的 DNA 样本。

表 1 2 个群体的来源和特征

Table 1 The sources and description of Pbb69 and Pbb70 used in the study

群体 Population	来源 Origin	种质特征 Characteristic
Pbb69	CIMMYT	亚热带中熟,黄色硬粒型 QPM Subtropical and intermediate maturity QPM pool with yellow and hard endosperm
Pbb70	CIMMYT	亚热带中晚熟,黄色半马齿 QPM Subtropical and intermediate maturity QPM pool with yellow and semi-dent endosperm

### 1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 采用 Saghai-Maroo 等<sup>[10]</sup>提出的 CTAB 法提取并纯化 DNA。用 Beckman DU-65 型分光光度计检测 DNA 的质量和浓度,把 DNA 的工作浓度定为 10 ng/μL,备用。

#### 1.2.2 扩增反应和变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测

PCR 扩增反应在 PTC-200 扩增仪上进行,反应总体积为 10 μL,反应成分包括 1 × PCR 缓冲液、150 μmol/L dNTP、0.5 U *Taq* 聚合酶、20 ng DNA 模板、0.25 μmol/L SSR 引物。扩增程序为 94 模板 DNA 预变性 4 min,1 个循环;94 模板 DNA 变性 1 min,60 引物与模板靶位点结合 1 min,72 引物沿模板延伸 2 min,共 35 个循环;最后 72 延伸 5 min。以 pBR322/ *Msp* 片段为分子量标准,在 4.5% 聚丙烯酰胺凝胶上电泳,银染观察结果。

1.2.3 数据统计分析 SSR 扩增带型以 0、1、9 统计,建立数据库。在相同迁移率位置上,有带记为 1,无带记为 0,缺失记为 9。50 个单株的每一个 SSR

位点的多态性信息量 (polymorphism information content, PIC) 按 Smith 等<sup>[3]</sup>的方法计算, 即  $PIC = 1 - \sum f_i^2$ , 其中  $f_i$  为  $i$  位点的基因频率。每一个群体的遗传多样性指数根据 Weir<sup>[11]</sup>提出的公式计算, 即  $D = 1 - \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{a_i} p_{ij}^2$ , 其中  $p_{ij}$  是第  $i$  个标记位点的第  $j$  个等位基因的频率,  $a_i$  是第  $i$  个标记位点的等位基因数目,  $m$  为标记位点数目。以 Jaccard 系数<sup>[12]</sup>计算单株间的遗传相似系数 (genetic similarity, GS), 即  $GS_{(jk)} = a / (a + b + c)$ , 其中  $a$  为  $j$  和  $k$  单株共有的位点数;  $b$  为  $j$  有而  $k$  无的位点数;  $c$  为  $k$  有而  $j$  无的位点数。

## 2 结果与分析

### 2.1 2 个群体遗传变异分析

通过单株分析法, 用 17 对 SSR 引物分别研究了 Pbb69 和 Pbb70 群体的遗传变异。在 Pbb69 群体中共检测到 72 个等位基因, 而在 Pbb70 群体中检测到 73 个等位基因; Pbb69 的平均等位基因数为 4.2, Pbb70 群体为 4.3, 变化范围都为 2~7; Pbb69 群体的 PIC 变幅为 0.258~0.800, 而 Pbb70 群体的 PIC 变

幅为 0.388~0.777。

根据遗传多样性分析, Pbb69 群体的遗传多样性指数为 0.569, Pbb70 群体为 0.616, 这与大多数 CIMMYT 群体的遗传多样性指数基本一致<sup>[13]</sup>。从遗传相似系数来看, 在 Pbb69 群体内单株间的最大相似系数为 0.667, 最小为 0.184, 平均为 0.445; 而 Pbb70 群体内单株间的最大相似系数为 0.689, 最小为 0.069, 平均为 0.368。可以看出, 2 个群体内单株间的遗传距离较大, 反映出群体具有较丰富的遗传变异。因此, 用这样的群体建立的技术体系可用于大多数玉米群体的遗传多样性研究。

### 2.2 2 个群体单株 DNA 样本与多株混合叶片提取的 DNA 样本的 PCR 扩增比较

利用 17 个均匀分布在玉米 10 条染色体上的 SSR 引物, 对 Pbb69 和 Pbb70 群体中 50 个单株的 DNA 和多株叶片混合提取的 DNA 样本进行扩增。图 1 显示, 引物 phi072 对 Pbb70 群体不同 DNA 样本的扩增结果。单株 DNA 的扩增带型比较清楚, 而混合 DNA 样本的带型可以基本包含单株 DNA 的扩增带。混合 DNA 样本 (最后 5 个泳道) 包含的单株数目越多, 扩增带型越显不清晰, 分辨率也随之降低。

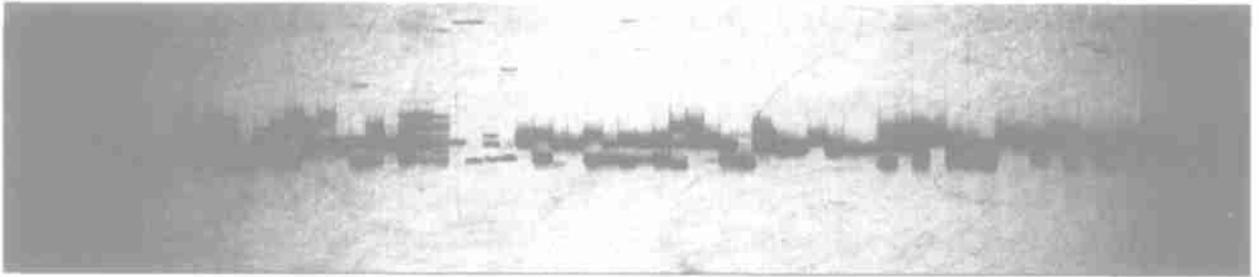


图 1 引物 phi072 对 Pbb70 不同 DNA 样本的扩增带型

Fig. 1 PCR product landing pattern of 50 individuals and 4 kinds of DNA samples from leaf mixture of Pbb70 amplified by phi072

从表 2 和表 3 可以看出, 对单株 DNA 样本扩增获得的等位基因数最多, 其余依次为 5 株、10 株、15 株和 20 株叶片混合提取的 DNA 样本。但是对于 5 株和 10 株混合 DNA 样本 (此处的 DNA 混合样本是指多株叶片混合提取的 DNA 样本) 未检测到的等位基因多为稀有基因, 其频率都小于 0.05。而采用 15 株和 20 株混合 DNA 样本所未能检测到的等位基因数目进一步减少, 且某些较高频率的等位基因也被漏检。如用引物 UMC1061 扩增 Pbb69 群体时, 未能检测到频率为 0.13 的等位基因; 在扩增 Pbb70 群体时未能检测到频率为 0.16 和 0.18 的 2 个等位基因。

这表明多株混合叶片提取的 DNA 中包含的单株数目越多, 漏检的等位基因数目也随之增加。

相关分析 (表 4) 表明, 单株 DNA 与 5 株和 10 株混合叶片 DNA 样本扩增所获得的等位基因数目显著相关 (Pbb69 分别为 0.913\* 和 0.913\*, Pbb70 为 0.909\* 和 0.869\*), 而与 15 株和 20 株混合 DNA 样本扩增所获得的等位基因数目的相关性则明显下降 (Pbb69 分别为 0.689 和 0.698, Pbb70 分别为 0.816\* 和 0.863\*)。为了减少工作量, 可以用若干个 10 株叶片混合提取的 DNA 样本代替同等数目的单株 DNA 进行群体遗传变异分析。

表 2 Pob69 群体内单株 DNA 样本和多株混合叶片提取的 DNA 样本获得的等位基因数目比较  
Table 2 The number of alleles detected among individual DNA and bulking DNA from leaf mixture in Pob69

编号 Code	引物 Primer	染色体位置 Chromosome	A		B		C		D		E	
			4	4	3	3	2	2	3	3	2	2
			缺少的等位基因频率 Frequency of the absent allele		缺少的等位基因频率 Frequency of the absent allele		缺少的等位基因频率 Frequency of the absent allele		缺少的等位基因频率 Frequency of the absent allele		缺少的等位基因频率 Frequency of the absent allele	
1	phi056	1.01	4	4			3	0.03	3	0.03	3	0.03
2	phi011	1.09	3	3			2	0.01	2	0.01	2	0.01
3	phi96100	2.00	6	5	0.01		5	0.01	4	0.01	4	0.01
4	umc1555	2.02 - 2.03	6	6			4	0.02	4	0.02	5	0.02
								0.02		0.02		
5	umc1026	2.04	3	3			3		3		3	
6	phi374188	3.02	3	3			3		3		3	
7	phi072	4.00	6	6			5	0.02	5	0.02	5	0.02
8	phi213984	4.01	2	2			2		2		2	
9	phi085	5.07	6	4	0.02		4	0.02	4	0.02	4	0.02
					0.01			0.01		0.01		0.01
10	phi078	6.05	2	2			2		2		2	
11	phi328175	7.04	3	3			3		3		3	
12	umc1161	8.06	5	4	0.01		5		3		4	0.01
13	phi080	8.08 - 8.09	7	6	0.05		6					
14	phi065	9.03	4	4			3	0.03	3	0.03	3	0.03
15	phi041	10.00	6	4	0.02		6		2	0.02	2	0.02
					0.02					0.02		0.02
										0.05		0.05
										0.05		0.05
16	phi062	10.04	2	2			2		2		2	
17	umc1061	10.06	4	4			3	0.03	2	0.13	2	0.13
										0.03		0.03
										0.01		0.01
总数 Total			72	65			61		47		49	
平均数 Mean			4.235	3.824			3.588		2.765		2.882	

表 3 Pob70 群体内单株 DNA 样本和多株混合叶片提取的 DNA 样本获得的等位基因数目比较  
Table 3 The number of alleles detected among individual DNA and bulking DNA from leaf mixture in Pob70

编号 Code	引物 Primer	染色体位置 Chromosome	A		B		C		D		E	
			4	4	3	3	2	2	3	3	2	2
			缺少的等位基因频率 Frequency of the absent allele		缺少的等位基因频率 Frequency of the absent allele		缺少的等位基因频率 Frequency of the absent allele		缺少的等位基因频率 Frequency of the absent allele		缺少的等位基因频率 Frequency of the absent allele	
1	phi056	1.01	4	4			4		3	0.05	3	0.05
2	phi011	1.09	3	2	0.04		2	0.04	2	0.04	2	0.04
3	phi96100	2.00	5	4	0.02		4	0.02	4	0.02	3	0.02
												0.04
4	umc1555	2.02 - 2.03	5	5			5		5		5	
5	phi374118											
		3.02	4	4			4		3	0.03	3	0.04
6	nc030	3.04	3	2	0.04		2	0.04	2	0.04	2	0.04
7	phi053	3.05	6	6			6		6		4	0.01
												0.01
8	umc1399	3.07	5	4	0.04		4	0.04	3	0.04	3	0.04
9	phi072	4.00	6	6			6		6		5	0.18
10	umc1186	6.02	2	2			2		2		2	
11	phi031	6.04	7	5	0.06		5	0.06	5	0.06	5	0.06
					0.01			0.01		0.01		0.01
12	phi078	6.05	4	4			3	0.06	3	0.06	3	0.06
13	umc1161	8.06	4	4			4		4		3	
14	phi065	9.03	4	4			4		3	0.06	4	
15	phi041	10.00	6	6			4	0.03	3	0.09	4	0.03
								0.03		0.03		0.03
										0.03		
16	phi062	10.04	2	2			2		2		2	
										0.16		0.16
17	umc1061	10.06	3	3			3		2	0.03	2	0.03
总数 Total			73	67			64		58		55	
平均数 Mean			4.294	4.1			3.765		3.412		3.235	

表4 应用单株 DNA 与多株混合叶片提取的 DNA 样本获得的等位基因数目的相关分析

Table 4 Correlation of alleles detected among individual DNA and 4 kinds of bulking DNA samples in two populations

	A	B	C	D	E
			<b>Pob69</b>		
A	-	0.913 *	0.913 *	0.689	0.698
B	0.909 *	-	0.777	0.786	0.778
C	0.869 *	0.924 **	-	0.536	0.578
D	0.816 *	0.832 *	0.933 **	-	0.917 *
E	0.863 *	0.874 *	0.878 *	0.849 *	-
			<b>Pob70</b>		

注: \*, \*\*分别表示在 0.05 和 0.01 水平下相关显著。

Note: \* and \*\* mean significant at 0.05 and 0.01 probability levels, respectively ( $r_{0.05} = 0.811$ ,  $r_{0.01} = 0.917$ ).

### 2.3 多株叶片混合提取的 DNA 与单株 DNA 混合样本的扩增结果比较

仅用 14 对 SSR 引物和群体 Pob69 来分析多株叶片混合提取的 DNA 与单株 DNA 混合样本的扩增结果。从表 5 可以看出,用 10 株叶片混合提取的 DNA 与用这 10 个单株 DNA 的混合样本(用 C 表示)扩增获得的等位基因数目相同,未发现差异。而采用 5 株叶片混合提取的 DNA 与这 5 个单株 DNA 的混合样本(用 B 表示)在 3 个引物上的扩增结果有差异。用引物 umc1555 对多株叶片混合提取的 DNA 扩增得到 4 个等位基因,而单株 DNA 混合样本则获

得 6 个等位基因,未检测到的 2 个等位基因的频率分别为 0.02 和 0.04。对于引物 phi374118,对单株 DNA 的混合样本漏检 1 个等位基因,其频率为 0.08。用引物 phi085 对多株叶片混合提取的 DNA 少扩增出 2 个等位基因,其频率分别为 0.05 和 0.16。在 10 株叶片混合提取的 DNA 与这 10 个单株 DNA 的混合样本之间扩增结果未发现差异,可能与引物较少有关。但总的来说,可以用多株叶片混合提取 DNA 来代替单株 DNA 的混合样本,这样既可以减少群体遗传多样性分析时提取 DNA 的工作量,又减少了电泳量,因而能明显地降低成本,提高效率。

表5 多株叶片混合提取 DNA 与单株 DNA 混合样本的扩增结果比较

Table 5 Gene frequency amplified between bulking DNA samples from leaf mixture and bulks of individual DNA

引物 Primer	B		C		C	
	缺少的等位基因频率 Frequency of the absent allele					
phi056	3		3		3	3
phi011	2		2		2	2
umc1555	4	0.02 0.04	6		5	5
umc1026	3		3		2	2
phi374118	3		2	0.08	3	3
phi072	6		6		6	6
phi213984	2		2		2	2
phi085	3	0.05 0.16	5		3	3
phi078	2		2		2	2
phi328175	3		3		3	3
umc1161	4		4		5	5
phi080	4		4		3	3
phi041	6		6		6	6
phi062	2		2		2	2
总数 Total	47		50		47	47

## 3 讨论

### 3.1 单株 DNA 样本与多株叶片混合提取的 DNA 样本在研究玉米群体遗传多样性中的应用

根据单株样本研究群体的遗传多样性,可以比较全面地分析群体的等位基因数、等位基因频率及遗传结构,还可以检测群体中的稀有基因,因此能全面地反映群体的遗传变异。但是如果研究的群体数

目很多,采用单株提取 DNA 的方法将花费大量的人力、物力和财力。为了降低成本、提高效率,提出了混合取样的方法。分析表明,对 5 株和 10 株混合叶片的 DNA 样本与单株 DNA 样本进行扩增,获得的等位基因数目的相关性最高。由于混合叶片 DNA 样本的扩增带型不是很清楚,混合的单株数目越多导致读带越困难,亦会产生不同的读带结果。

由于用多株混合叶片的 DNA 样本进行 SSR 标

记分析不能计算等位基因频率,故不能分析群体内的遗传变异,而仅能计算群体间的遗传距离。分析表明,用多株混合叶片的 DNA 样本检测不出一些频率很低的等位基因,这会使检测到的群体遗传信息有所降低。Dubreuil 等<sup>[9]</sup>和 Rebourg 等<sup>[14]</sup>分别用混合取样方法研究了 10 个和 65 个群体的遗传关系,每个群体取 10 株为 1 个混合样本,他们的研究表明,用混合取样策略可以有效地反映群体的等位基因变异,可以对一些不知来源或者来源不确定的群体划分杂种优势群。从本文结果也可看出,混合取样虽然会使群体的遗传信息有所降低,但可以用来分析群体间的遗传关系。

本文结果表明,用 10 株混合叶片提取的 DNA 样本所得到的等位基因数目与 5 株混合样本的差别只是一些基因频率很低的基因。在 P0b70 群体中,用 5 株和 10 株叶片混合提取的 DNA 样本获得的等位基因数目达到极显著高度相关,在 P0b69 群体中也近显著水平;因而可以用 10 株叶片混合提取的 DNA 样本代替 5 株样本用于群体的遗传变异分析。一般在 DNA 扩增过程中引物会竞争靶位点,进而引起扩增反应。如果混合样本中有一个单株的 DNA 量少,那么在扩增过程中该模板 DNA 可能无法与引物结合,不能被扩增。用 15 和 20 株叶片混合提取的 DNA 样本也可以揭示群体的遗传变异,但是混合样本中的单株数目越多,电泳效果则越不好,也就越不容易区分带型。因此,在研究群体间的遗传变异时建议用 10 株叶片混合提取 DNA 样本。

### 3.2 多株叶片混合提取的 DNA 和单株 DNA 的混合样之间的扩增效果比较

用单株 DNA 的混合样本进行群体遗传多样性分析是可行的,提取单株 DNA 后再混合,可以减少一部分工作量,但是如果采用多株叶片混合提取 DNA,则会更大程度地降低工作量和减少费用。本文结果证明,用多株叶片混合提取的 DNA 和用单株 DNA 混合样本的扩增结果基本一致。未能检测到的基因频率大多小于 0.05,这说明用多株叶片混合提取的 DNA 可以代替单株 DNA 的混合样本。

采用多株混合叶片提取的 DNA 样本,基于聚丙烯酰胺凝胶电泳和 PCR 扩增技术,本实验室建立了玉米群体分析的技术策略,目前已大规模地用于分析国内外玉米群体间的遗传关系。在研究群体遗传多样性时,如果仅是分析许多群体间的遗传关系,则可以采用此技术。这一技术策略对仪器设备和流程的要求相对简单。如果既要研究群体间的遗传

关系,还要考察群体内的遗传变异,则宜采用单株进行分析。

### References

- [1] Reif J C, Melchinger A E, Xia X C. Genetic distance based on simple sequence repeats and heterosis in tropical maize population. *Crop Sci*, 2003, **43**: 1 275 - 1 282
- [2] Liu X-Z (刘新芝), Peng Z-B (彭泽斌), Fu J-H (傅骏骅), Li L-C (李连城), Huang C-L (黄长玲). The utility of RAPD in maize heterotic groups. *Scientia Agricultura Sinica* (中国农业科学), 1997, **30** (3): 44 - 51 (in Chinese with English abstract)
- [3] Smith J S C, Chin E C L, Shu H. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.) comparison with data from RFLPs and pedigree. *Theor Appl Genet*, 1997, **95**: 163 - 173
- [4] Ajmone-Marsan P, Castiglioni P, Fusari F, Kuiper M, Motto M. Genetic diversity and its relationship to hybrid performance in maize as revealed by RFLP and AFLP markers. *Theor Appl Genet*, 1998, **98**: 219 - 227
- [5] Yuan L-X (袁力行), Fu J-H (傅骏骅), Warburton M, Li X-H (李新海), Zhang S-H (张世煌), Khairallah M, Liu X-Z (刘新芝), Peng Z-B (彭泽斌), Li L-C (李连城). Comparison of genetic diversity among maize inbred lines based on RFLPs, SSRs, AFLPs and RAPDs. *Acta Genetica Sinica* (遗传学报), 2000, **27** (8): 725 - 733 (in Chinese with English abstract)
- [6] Liu X-J (刘勋甲), Zheng Y-L (郑用琏), Liu J-L (刘纪麟). Genetic diversity evaluation of maize recurrent selection population with RAPD marker. *Scientia Agricultura Sinica* (中国农业科学), 1999, **32** (3): 4 - 20 (in Chinese with English abstract)
- [7] Huang S-H (黄素华), Teng W-T (滕文涛), Wang Y-J (王玉娟), Dai J-R (戴景瑞). Genetic diversity analysis of maize recurrent selection population by SSR marker. *Acta Genetica Sinica* (遗传学报), 2004, **31** (1): 73 - 80 (in Chinese with English abstract)
- [8] Marshall D R, Brown A H D. Optimum sampling strategies in genetic conservation. In: Frankel O H, Hawkes J G ed. *Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow*. Cambridge, England: Cambridge Univ Press, 1975. 53 - 80
- [9] Dubreuil P, Rebourg C, Merlino M, Charcosset A. Evaluation of a DNA pool-sampling strategy for estimating the RFLP diversity of maize populations. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1999, **17**: 123 - 138
- [10] Saghai-Marouf M A, Soliman K M, Jorgenson R, Allard R W. Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, **81**: 8 014 - 8 018
- [11] Weir B S. *Genetic Data Analysis* (2nd ed). Sinauer Associates, Sunderland, MA. 1996
- [12] Jaccard P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull Soc Vaud Sci Nat*, 1908, **44**: 223 - 270
- [13] Reif J C, Xia X C, Melchinger A E, Warburton M L, Hoisington D A, Beck D, Bohn M, Frisch M. Genetic diversity determined within and among CIMMYT maize populations of tropical, subtropical and temperate germplasm by SSR marker. *Crop Sci*, 2004, **44**: 326 - 334
- [14] Rebourg C, Dubreuil P, Charcosset A. Genetic diversity among maize populations: bulk RFLP analysis of 65 accessions. *Maydica*, 1999, **44**: 237 - 249